



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

SRO como ferramenta no diagnóstico da infertilidade por fator masculino

Jorge Medeiros Vasconcelos

Julho'2019



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

SRO como ferramenta no diagnóstico da infertilidade por fator masculino

Jorge Medeiros Vasconcelos

Orientado por:

Dr. Joaquim Nunes

Julho'2019

Resumo:

A infertilidade é considerada um problema global de saúde pública, afetando 15% dos casais em idade fértil, sendo o fator masculino responsável por cerca de 50% dos casos. O interesse ao nível molecular tem vindo a crescer uma vez que até cerca de 40% dos casos permanece sem etiologia. Recentemente, as SRO têm sido apontadas como parte do mecanismo fisiopatológico da infertilidade por fator masculino devido ao seu efeito tóxico sobre as estruturas celulares. Os níveis de SRO encontram-se aumentados em 30-64% dos indivíduos inférteis, variando com o método e população utilizados, relação essa, que também se verifica no subgrupo de indivíduos com infertilidade idiopática. O nível de *stress* oxidativo também se correlaciona, embora de forma heterógena, com indicadores da qualidade dos espermatozoides. O *stress* oxidativo está assim altamente correlacionado com a infertilidade por fator masculino mostrando boa capacidade diagnóstica e superioridade aos parâmetros espermáticos individuais. Começa assim a surgir evidência de que os níveis de SRO podem ser utilizados como ferramenta para diagnóstico ou triagem de infertilidade masculina, sempre numa abordagem integrada e, eventualmente, como base para intervenções terapêuticas.

Palavras-chave: Infertilidade; *Stress* oxidativo; Substâncias Reativas de Oxigénio; Diagnóstico; Função espermática.

Abstract:

Infertility is considered a global public health problem affecting 15% of couples of childbearing age, with the male factor accounting for about 50% of cases. Interest at the molecular level has been growing since as up to 40% of the cases remain without etiology. Recently, ROS have been implicated in the pathophysiological mechanism of male factor infertility due to its toxic effect on cell structures. The levels of ROS are increased in 30-64% of the infertile individuals, varying with the method and population used, which is also observed in the subgroup of individuals with idiopathic infertility. The level of oxidative stress also correlates, albeit heterogeneously, with indicators of sperm quality. The oxidative stress is thus highly correlated with infertility by male factor, showing good diagnostic capacity and superiority when compared with individual sperm parameters. Evidence emerges that ROS levels can be used as a tool

for the diagnosis or screening of male infertility in an integrated approach and, possibly, as a basis for therapeutic interventions.

Key-Words: Infertility; Oxidative stress; Reactive Oxygen species; Diagnosis; Sperm Function.

Índice

Introdução.....	6
A infertilidade	6
Substâncias Reativas de Oxigénio e <i>Stress</i> Oxidativo	6
Papel fisiológico das SRO.....	7
Papel fisiopatológico das SRO.....	7
Objetivos	9
Materiais e Métodos	10
Resultados	11
Discussão	13
Indivíduos Inférteis e níveis de SRO.....	13
Indivíduos Inférteis e os níveis de AMD e 8-OHdG	13
Parâmetros Espermáticos e SRO	14
A infertilidade Idiopática e o <i>stress</i> oxidativo	15
História de abortos espontâneos de repetição e as SRO	17
Técnicas de PMA e SRO	17
Métodos de avaliação do <i>stress</i> oxidativo	18
A utilização destes métodos no diagnóstico de indivíduos inférteis.....	19
Conclusão	23
Agradecimentos	24
Bibliografia	25

Introdução

1. A infertilidade

A infertilidade é definida pela OMS como a incapacidade de engravidar ou de levar uma gravidez até ao parto num período de 12 meses consecutivos em que o casal mantenha relações sexuais regulares e desprotegidas¹. Esta entidade é atualmente considerada como um problema global de saúde pública, com uma prevalência global, apesar de ser considerado um problema com dimensão subestimada, de 15% dos casais em idade fértil.²

As causas de infertilidade são várias e geralmente são divididas em fatores masculinos, fatores femininos ou uma combinação entre ambos.³ O fator masculino é identificado como sendo responsável por cerca de 50% dos casos de infertilidade⁴. No entanto, em até 40% dos casos o mecanismo responsável não é identificado⁵, recebendo o nome de infertilidade idiopática.

A avaliação do fator masculino deve ser sempre efetuada perante um casal que preencha a definição de infertilidade e a abordagem inicial deve ser feita com recurso a uma história clínica completa e uma análise ao esperma recorrendo ao espermograma.⁶ O espermograma é assim um teste central na avaliação inicial da infertilidade masculina, no entanto, com exceção dos casos de azoospermia e oligospermia grave, o seu valor diagnóstico e prognóstico é muito discutido, uma vez que não reflete todos os parâmetros de funcionalidade e qualidade do esperma.⁷ Este aspeto adquire a sua máxima relevância nos casos de infertilidade idiopática.⁸

2. Substâncias reativas de oxigénio e stress oxidativo

Os radicais livres são moléculas com um ou mais eletrões desemparelhados o que as torna altamente reativas e com potencialidade de oxidar outras moléculas, alterando a sua estrutura e/ou função.⁹ Os radicais livres que derivam do metabolismo do oxigénio recebem o nome de Substâncias reativas de Oxigénio (SRO)¹⁰, das quais o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e os radicais peróxido (ROO^{\bullet}) e hidróxilo (OH^{\bullet}) são os mais comuns e com potenciais implicações na fertilidade.¹¹

O *stress* oxidativo é uma condição associada a um aumento da taxa de lesão celular que pode surgir devido a uma produção excessiva de SRO ou devido a uma limitação dos mecanismos antioxidantes presentes no líquido seminal.¹¹

2.1 Papel fisiológico das SRO

A origem fisiológica destes radicais livres reside nos leucócitos peroxidase positivos (macrófagos e leucócitos polimorfonucleares) e nos espermatozoides.¹² As mitocôndrias são as principais responsáveis pela geração das SRO, produzindo o anião Superóxido como um subproduto do metabolismo aeróbio. Este pode ser convertido a peróxido de hidrogénio, através da enzima superóxido dismutase, o qual, por meio de antioxidantes enzimáticos- enzima catalase ou enzima glutathione peroxidase-, é convertido a H₂O. Uma alternativa à neutralização das SRO são os múltiplos compostos antioxidantes não enzimáticos, como a vitamina C, vitamina E e taurina.¹³⁻¹⁵ Desta forma o líquido seminal consegue manter um nível fisiológico e controlado de radicais livres¹⁶.

As SRO têm um papel importante nas cascatas bioquímicas que ocorrem nos espermatozoides, com efeito na sua maturação, hiperativação e capacitação, sendo a sua presença também necessária para que ocorra a reação acrossômica e a fusão do espermatozoide com o oócito. Assim, a existência deste nível fisiológico de SRO é essencial para a normal função espermática e para que ocorra a fertilização.¹⁷

2.2 Papel fisiopatológico das SRO

Recentemente, as SRO, devido ao seu potencial tóxico para as estruturas celulares, têm sido apontados como parte integrante do mecanismo fisiopatológico de várias doenças, como neoplasias, doenças cardiovasculares, doenças do neurónio motor, entre outras¹⁸, podendo, quando presentes em quantidades excessivas no sêmen, também exercer um papel relevante na fisiopatologia da infertilidade masculina.

Para além da origem endógena de SRO, existem um conjunto de fatores exógenos e situações patológicas, como poluentes ambientais, tabagismo, consumo de álcool, lesões na medula espinhal, infeções, espermatozoides com defeitos no seu desenvolvimento e varicocelo, que podem resultar num aumento de SRO ao nível do sêmen e, conseqüentemente, ao ultrapassar a capacidade dos mecanismos antioxidantes dos espermatozoides, levar a graves lesões celulares.¹⁹⁻²³ A lesão celular resultante pode envolver todos os componentes celulares,²⁴ sendo a lipoperoxidação e a lesão do ADN

os dois principais mecanismos pelo qual o *stress* oxidativo afeta a função dos espermatozoides.²⁵

A membrana dos espermatozoides humanos é constituída, em grande quantidade, por lípidos, nomeadamente por ácidos gordos polinsaturados. Estes têm uma grande importância na fisiologia do espermatozoide, uma vez que são responsáveis pela manutenção da sua fluidez. No entanto, a sua estrutura molecular torna-os muito suscetíveis à ação das SRO, nomeadamente devido ao grupo metileno entre duas duplas ligações carbono-carbono que torna as ligações carbono-hidrogénio do grupo metileno fracas, reagindo com uma SRO num processo que tem o nome de lipoperoxidação.²⁴ A oxidação dos ácidos gordos polinsaturados e a sua propagação vão levar a modificações na membrana dos espermatozoides comprometendo os mecanismos necessários para que ocorra a fertilização,⁴ para além do que os próprios produtos da lipoperoxidação podem também ser responsáveis por lesões do ADN.²⁵

O *stress* oxidativo tem a capacidade de induzir lesões no ADN como deleções, fragmentações ou outros defeitos genéticos que, por sua vez, podem levar à perda de função do espermatozoide ou à sua apoptose.¹⁸

As substâncias reativas de oxigénio têm sido assim fonte de estudo como potencial marcador fisiopatológico da infertilidade por fator masculino e pelo seu potencial em auxiliar o diagnóstico, prognóstico e a abordagem terapêutica destes doentes.

Objetivo

Este trabalho é uma revisão bibliográfica sobre a questão: “Poderão as SRO ser utilizadas na abordagem diagnóstica da infertilidade por fator masculino?”

Materiais e Métodos

A pesquisa bibliográfica foi realizada na base de dados PubMed, com as palavras-chave: Infertilidade masculina; *stress* oxidativo; substâncias reativas de oxigénio; diagnóstico; função espermática.

Os artigos foram avaliados segundo os seguintes critérios de inclusão:

- Estudos que correlacionam a infertilidade com as SRO/produtos resultantes do *stress* oxidativo ou estes com alterações na função espermática.
- Estudos clínicos em humanos.
- Artigos escritos em português ou inglês.

Não foram feitas restrições temporais, nem restrições no método de análise de SRO/produtos resultantes do *stress* oxidativo.

Foram excluídos os artigos que estudavam doentes inférteis com um diagnóstico etiológico específico.

Resultados

A pesquisa incluiu 627 artigos, aos quais foram aplicados os critérios de inclusão e exclusão, sendo incluídos neste trabalho 33 artigos.

Os artigos utilizados distribuíram-se geograficamente por 14 países (EUA, Reino Unido, Brasil, Índia, Taiwan, Tunísia, Austrália, China, Turquia, Itália, Colômbia, Irão, Qatar e Egito), com maior superioridade de estudos realizados nos EUA.

O número de indivíduos com infertilidade envolvidos nos vários artigos variou entre 10 e 1092. Os critérios de inclusão dos indivíduos inférteis também variaram entre os artigos, sendo que alguns artigos não aplicaram critérios quanto ao tipo, etiologia e fatores que afetam a fertilidade, enquanto outros fazem algumas restrições, ocorrendo mais repetidamente a exclusão de pacientes com azoospermia, sendo também frequente a exclusão de pacientes com aumento dos leucócitos no sêmen. Para além disto, 8 artigos têm como população apenas indivíduos com infertilidade idiopática, 1 artigo refere-se apenas a homens de casais com abortos espontâneos recorrentes e ainda 1 artigo avalia uma população de 38 indivíduos submetidos a tratamento por ICSI. Há ainda alguns artigos que avaliam apenas indivíduos inférteis sem alterações dos parâmetros espermáticos, enquanto outros estudam apenas indivíduos inférteis com alterações no espermograma.

A avaliação do *stress* oxidativo é abordada de forma diferente entre os artigos aqui incluídos. A maioria utiliza a determinação dos níveis de SRO através de um método que utiliza a quimioluminescência. No entanto, estão incluídos na revisão artigos que utilizam produtos que se formam como consequência da lesão causada pelas SRO, como o ácido malondialdeído (AMD), um produto da lipoperoxidação, ou o 8'-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), que se forma devido à oxidação do ADN. Para além disto, são ainda utilizadas outras formas para avaliar o *stress* oxidativo nas amostras de sêmen, nomeadamente, um *score* que combina o nível de SRO com a medição da capacidade antioxidante total (CAT), formando um *score* SRO-CAT, e ainda um método que utiliza o potencial oxidação-redução (POR), que fornece uma medida abrangente do balanço entre oxidantes e antioxidantes. Nesta revisão, há um artigo que, ao contrário dos restantes, não avalia o *stress* oxidativo, mas utiliza a incubação dos espermatozoides com H₂O₂, induzindo assim um estado de *stress* oxidativo.

É importante ainda referir que a população utilizada como controlo divergiu entre os artigos. Vários artigos utilizaram apenas indivíduos dadores de esperma, outros utilizavam indivíduos saudáveis submetidos a uma avaliação de fatores que podiam interferir com a fertilidade, enquanto outros artigos selecionavam indivíduos saudáveis com fertilidade provada.

Discussão

1. Indivíduos inférteis e os níveis de SRO

Os artigos incluídos na revisão mostram, de forma consistente, que os níveis de SRO encontram-se mais elevados nos doentes inférteis quando comparados com os indivíduos utilizados como controlo.

Alguns artigos avaliaram ainda a prevalência de um nível elevado de SRO nas amostras obtidas de indivíduos inférteis, sendo que o valor mínimo e máximo obtido foi de 30%²⁶ e 64%³⁰ respetivamente.

Neste sentido, as evidências clínicas sugerem que há de facto uma relação entre a infertilidade por fator masculino e os níveis de SRO. O facto de estas substâncias estarem aumentadas numa percentagem elevada de casos de indivíduos inférteis leva ao conceito de que possam ser utilizadas de alguma forma na abordagem ao doente com infertilidade.

2. Indivíduos inférteis e os níveis de ácido malondialdeído (AMD) e de 8'-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG)

Tanto o AMD e o 8-OHdG são utilizados, por alguns artigos, como método para avaliar o *stress* oxidativo, uma vez que são formados como consequência da lipoperoxidação e do dano oxidativo do ADN, respetivamente.

Um artigo publicado em 2017 por Dorostghoal e colaboradores mostra que nas amostras de indivíduos inférteis detetaram-se níveis mais elevados de AMD quando comparados com os dadores voluntários com fertilidade provada.⁵¹ Nos artigos aqui incluídos também se encontram correlações negativas entre a concentração, motilidade e morfologia normal dos espermatozoides tanto com os níveis de AMD^{33,36,38,44,51} como de 8-OHdG.^{33,46}

Assim, ao contrário da simples determinação do nível de SRO, estes marcadores refletem a lesão oxidativa, podendo também ter utilidade na abordagem ao indivíduo com infertilidade por fator masculino.

3. Parâmetros espermáticos e SRO

Os parâmetros espermáticos, geralmente utilizados no espermograma, como a concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides, foram também repetidamente avaliados nos diferentes artigos e correlacionados com a produção de SRO. A maioria dos artigos refere assim que níveis aumentados de SRO estão significativa e negativamente correlacionados com um ou mais destes parâmetros espermáticos convencionais. No entanto, há alguma dispersão na forma como se correlacionam, pois há artigos que encontram uma relação com os vários parâmetros, enquanto outros apenas descrevem uma correlação apenas com alguns ou mesmo com apenas um dos parâmetros convencionais.

Apesar de esta relação ser evidente em vários dos artigos incluídos, há um conjunto de 2 artigos que relatam que não foram encontradas nenhuma relação entre os níveis de SRO e os parâmetros espermáticos convencionais^{37,50}, sendo de considerar que foram estudos que incluíram uma população de indivíduos inférteis relativamente pequena (um artigo com 33 e outro com 23 indivíduos).

Para além destes parâmetros convencionais há artigos que utilizam ainda outros indicadores para avaliar a qualidade dos espermatozoides. Um artigo publicado por Nallella e colaboradores em 2005 avalia um *score* de qualidade, desenvolvido através de uma análise de 9 parâmetros individuais, e correlaciona-o de forma significativa e negativa com os níveis de SRO.³¹ Outro artigo, publicado em 2009 por Piyali Das e colaboradores, estabelece uma relação negativa entre os níveis de AMD e a percentagem de viabilidade das amostras de espermatozoides.³⁸ Outro artigo, elaborado por Fatma B. Abdallah e colaboradores em 2009, mostra uma correlação significativa e positiva entre os níveis de AMD e anormalidades acrossómicas e retenções citoplasmáticas.³⁶ Finalmente, há ainda 2 artigos que correlacionam significativa e positivamente os níveis de SRO com danos acrossómicos, defeitos da cauda, defeitos da cabeça, retenções citoplasmáticas e com o índice de deformidade dos espermatozoides.^{30,43}

Apesar do potencial efeito negativo das SRO sobre os espermatozoides, também é verdade que os espermatozoides imaturos com anormalidades são uma fonte de maior produção de SRO e sendo assim, não é claro se o aumento de SRO nas amostras de indivíduos com infertilidade é uma consequência ou efeito de parâmetros espermáticos

anormais.⁸ No entanto, há evidência científica de que o aumento de SRO provoca de facto alterações nos parâmetros espermáticos. Um artigo publicado em 2000 por Duru e colaboradores mostra que a incubação de espermatozoides com H₂O₂ leva a um efeito, dose dependente, nos parâmetros de motilidade²⁷, assim como outro artigo de 2004 elaborado por T.M. Said e colaboradores mostra que o aumento dos níveis de O₂^{•-}, em resposta a NADPH exógeno, está relacionado negativamente com a concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides.²⁹

O *stress* oxidativo está ainda associado a um aumento dos níveis de fragmentação do ADN^{27,34,40,41,45,55} assim como a um aumento no número de espermatozoides que estão em início do processo de apoptose.^{28,41}

Estes dados apontam assim para uma relação negativa entre os níveis de SRO ou *stress* oxidativo e diferentes parâmetros espermáticos que refletem a qualidade dos espermatozoides e que indiretamente refletem, embora não exaustivamente, a capacidade dos mesmos em fertilizar um oócito.

Por um lado, amostras com maiores níveis de SRO têm parâmetros espermáticos em níveis mais baixos, por outro lado, como também é evidenciado por alguns artigos aqui incluídos, indivíduos inférteis com alterações nos parâmetros espermáticos têm níveis de SRO^{8,34,38,42}, AMD^{36,44} ou ainda de POR^{52,56} mais elevados quando comparados com indivíduos inférteis normozoospermicos.

Assim, e como já sugerido pela variabilidade nas percentagens de amostras de indivíduos inférteis com SRO aumentadas, a utilização da determinação dos níveis de SRO, ou outros métodos para avaliar o *stress* oxidativo, na abordagem a indivíduos com infertilidade por fator masculino terá uma maior utilidade num grupo selecionado dentro desta população. Neste sentido, será nos indivíduos inférteis com alterações dos parâmetros espermáticos convencionais que a utilidade destes métodos será maior.

4. A infertilidade idiopática e o *stress* oxidativo

Apesar de várias patologias, que tenham impacto na fertilidade, poderem resultar num aumento das SRO ao nível do sémen, como é o exemplo de infeções ou o varicocelo, a própria resolução da patologia de base leva a uma reversão dos níveis de SRO, sem ser

necessário intervir diretamente no *stress* oxidativo. Por esta razão, na população de indivíduos inférteis com infertilidade idiopática o estudo e correção do *stress* oxidativo tem uma maior potencialidade de tornar uma atitude útil na abordagem a este grupo de pacientes.

Vários artigos incluídos nesta revisão estudam o efeito das SRO, ou produtos do *stress* oxidativo, apenas no subgrupo de indivíduos inférteis com infertilidade idiopática e apresentam resultados que vão no sentido de maiores níveis de SRO presentes nas amostras de indivíduos com infertilidade idiopática quando comparados com os grupos utilizados como controlo.^{28,32,35,37,45,50,55}

Destes artigos que estudam indivíduos com infertilidade idiopática, 2 artigos relatam que, apesar de estes pacientes inférteis terem maiores níveis de SRO, não se observam diferenças significativas ao nível dos parâmetros espermáticos (nomeadamente o número, motilidade progressiva e morfologia dos espermatozoides segundo o artigo de Aktan e colaboradores de 2013 e o volume, concentração, motilidade progressiva, viabilidade e morfologia dos espermatozoides segundo o estudo de Mayorga-Torres e colaboradores) entre os indivíduos com infertilidade idiopática e os grupos utilizados como controlo.^{45,50}

Um estudo publicado em 2007 por Athayde e colaboradores e outro artigo de 2017 de Zandieh e colaboradores documenta uma correlação negativa entre os níveis de SRO e a motilidade dos espermatozoides.^{32,55} No entanto, um conjunto de 2 artigos apresenta como resultados informação inversa, nomeadamente o artigo de 2009 por Venkatesh e colaboradores que não deteta nenhuma relação entre os níveis de SRO e o número, motilidade progressiva e morfologia dos espermatozoides, assim como o artigo de 2016 elaborado por Mayorga-Torres e colaboradores que também não mostra nenhuma relação entre o volume, concentração, motilidade progressiva, viabilidade e morfologia e os níveis de SRO, apesar de ambos os artigos documentarem um maior nível de SRO nos indivíduos com infertilidade idiopática.^{37,50}

Estes dados sugerem que os níveis de SRO também se correlacionam com a infertilidade neste subgrupo de indivíduos e ainda que o aumento destas substâncias possa ser um marcador independente das alterações dos parâmetros espermáticos convencionais.

5. História de abortos espontâneos de repetição e as SRO

Perante casais com história de abortos espontâneos de repetição as mulheres são sujeitas a uma investigação completa, enquanto o fator masculino é de certo modo ignorado, com exceção da análise citogenética.⁴² A lesão causada nos espermatozoides pelo *stress* oxidativo, nomeadamente ao nível do ADN, pode ter consequências mesmo após a formação do embrião, uma vez que a integridade do ADN do espermatozoide é importante para que posteriormente haja um normal crescimento e desenvolvimento do embrião.⁵⁸

O estudo de 2011 de Venkatesh e Colaboradores, estuda uma população de 48 homens pertencentes a casais com história de abortos espontâneos de repetição e mostra que um subgrupo destes indivíduos com alterações nos parâmetros espermáticos convencionais têm níveis de SRO significativamente superiores aos do subgrupo de indivíduos sem alterações dos parâmetros espermáticos assim como aos do grupo de homens utilizados como controlo.⁴²

Apesar de ser estudado em apenas um artigo incluído nesta revisão, mostra uma associação entre o *stress* oxidativo e os abortos espontâneos recorrentes, sendo que abre a possibilidade a que, após exclusão do fator feminino nestes casos, o fator masculino, e mais precisamente o estudo das SRO ou do *stress* oxidativo, seja ponderado com implicações diagnósticas, prognósticas e terapêuticas.

6. Técnicas de procriação medicamente assistida (PMA) e SRO

Uma vez que o *stress* oxidativo tem o potencial de afetar negativamente vários parâmetros associados à qualidade dos espermatozoides, a utilização de espermatozoides sujeitos ao dano oxidativo em técnicas de PMA pode alterar as taxas de sucesso das mesmas, havendo evidência de que os níveis de SRO estão, de forma negativa, correlacionados com as taxas de fertilização associadas à fertilização *in vitro* (FIV) e à injeção intracitoplasmática (ISCI).^{59,60}

Incluído nesta revisão está um artigo publicado em 2008 por Soumen Das e colaboradores que inclui no estudo um subgrupo de doentes inférteis submetidos a ICSI,

onde a taxa de fertilização, a taxa de gravidez e a taxa de nascimento mostraram-se negativamente relacionadas com os níveis de SRO.³⁴

O estudo do impacto do *stress* oxidativo no sucesso das técnicas de PMA pode ajudar a determinar o prognóstico destes casais submetidos a este tipo de tratamentos sendo ainda uma possível fonte de melhoria nas taxas de sucesso destas técnicas.

7. Métodos de avaliação do *Stress* Oxidativo

A forma mais comum para avaliar o *stress* oxidativo nas amostras de sémen é a determinação do nível de SRO, sendo que, apesar de existir vários métodos que podem ser utilizados, o método por quimioluminescência usando o luminol como sonda é o mais utilizado, havendo artigos publicados que afirmam ser um método preciso e com resultados reprodutíveis.^{49,61,62}

Para além da medição dos níveis de SRO é ainda possível utilizar produtos do *stress* oxidativo, como os níveis de AMD ou os níveis de 8-OHdG, ou ainda avaliar a capacidade antioxidante total (CAT) podendo ser combinado com os níveis de SRO formando o *score* SRO-CAT, havendo evidência que este *score* possa ser superior às determinações isoladas dos níveis de SRO ou da CAT.⁶³ O artigo incluído nesta revisão de Mahfouz e colaboradores de 2010 documenta que o *score* SRO-CAT foi significativamente superior no grupo de indivíduos com SRO em níveis aumentados.⁴⁰

Por fim, existe um método desenvolvido e estudado mais recentemente para aplicação nestes doentes que calcula o potencial oxidação-redução (POR), avaliando assim o balanço entre as substâncias oxidantes e antioxidantes e determinando diretamente o *stress* oxidativo, sendo ainda um teste rápido, fácil e custo-efetivo, ultrapassando assim algumas dificuldades de outros métodos.⁵⁴ Um estudo de 2017 por Agarwal e colaboradores mostra que a avaliação do POR em dois laboratórios, um nos EUA e outro no Qatar, manteve-se consistente tanto na base de dados de cada laboratório como na base de dados combinada, enquanto os outros parâmetros espermáticos revelaram diferenças significativas, provando ser um método reprodutível e fiável.⁵² Os artigos incluídos nesta revisão que avaliam os doentes inférteis com recurso ao POR mostram maiores níveis deste potencial em doentes inférteis comparando com os indivíduos utilizados como controlo, assim como correlações negativas entre o POR e os

parâmetros espermáticos convencionais (concentração, motilidade e morfologia).^{52-54,56,57} Para além disto, há ainda um artigo de 2017 por Agarwal e Wang, que mostra que nos pacientes que repetiram a análise dos parâmetros espermáticos e do POR, em média, após 16,8 semanas, o nível do POR diminuiu assim como aumentou a concentração e motilidade dos espermatozoides, sugerindo assim que o POR pode servir como um indicador da qualidade dos espermatozoides ao longo do tempo.⁵⁷

Neste sentido, existem várias formas possíveis de avaliar o *stress* oxidativo nas amostras de esperma, através de métodos reprodutíveis e fiáveis, sendo possível a sua incorporação na prática clínica.

7.1 A utilização destes métodos no diagnóstico de indivíduos inférteis

Uma das potencialidades da avaliação do *stress* oxidativo em amostras de sémen é a sua utilização como ferramenta para avaliar o estado da fertilidade de um indivíduo, auxiliando o diagnóstico e a tomada de decisão na abordagem aos indivíduos com infertilidade por fator masculino. Neste sentido, vários artigos incluídos nesta revisão avaliam a capacidade dos vários métodos de avaliação do *stress* oxidativo em distinguir amostras de indivíduos inférteis de amostras de indivíduos com fertilidade mantida.

O artigo publicado no ano 2005 por Nallella e colaboradores mostra que os níveis de SRO estão altamente correlacionados com a infertilidade por fator masculino sendo melhores indicadores que os parâmetros espermáticos individuais, obtendo-se uma sensibilidade de 83,47% e uma especificidade de 60,52% quando os níveis de SRO eram utilizados para diferenciar os indivíduos inférteis dos indivíduos utilizados como controlo sugerindo que os primeiros devem ser incluídos na triagem de infertilidade.³¹

No artigo de Agarwal e colaboradores de 2006 os resultados sugerem que os níveis de SRO são um marcador independente da infertilidade masculina uma vez que o logaritmo dos níveis de SRO mostrou ser um bom indicador da infertilidade masculina, mostrando uma sensibilidade de 70-78% e uma especificidade de 82%, mesmo quando ajustado para outras variáveis como a idade, nível de leucócitos e ainda níveis de concentração, morfologia e motilidade dos espermatozoides. O mesmo artigo mostra que os parâmetros espermáticos convencionais, exceto a motilidade dos espermatozoides, mostraram ser maus indicadores da infertilidade masculina.⁸

O estudo de Athayde e colaboradores de 2007 avalia ainda os níveis de SRO em amostras lavadas e não lavadas e com ou sem leucócitos utilizando diferentes *cut-offs* e mostrando uma precisão em diferenciar os indivíduos férteis dos indivíduos subférteis de 68-81%.³²

Um artigo de 2009 elaborado por Desai e colaboradores descreve uma sensibilidade de 77,8% e uma especificidade de 82,4% quando os níveis de SRO eram utilizados para diferenciar os indivíduos férteis de indivíduos inférteis, assim como o artigo de Agarwal e colaboradores de 2014 que mostra uma sensibilidade de 68,8% e uma especificidade de 93,8% e ainda o artigo de 2015 por Agarwal e colaboradores com uma sensibilidade e especificidade de 76,4% e 53,3% respectivamente. Estes artigos sugerem que os níveis de SRO podem ser utilizados como ferramenta para diagnóstico ou triagem de infertilidade masculina, como ferramenta de prognóstico para as técnicas de PMA e ainda como base para intervenções terapêuticas.^{39,47,49}

O artigo de Tunc e colaboradores de 2010 mostrou uma sensibilidade de 91,7% e uma especificidade de 81% utilizando o ensaio com nitroazul de tetrazólio para avaliar os níveis de SRO, sugerindo que este método também pode ser utilizado com maneira de distinguir entre indivíduos inférteis e indivíduos férteis.⁴¹

Outro artigo de 2014 elaborado por Agarwal e colaboradores avalia diferentes grupos de dadores (todos os dadores, dadores com fertilidade provada e dadores com fertilidade provada em menos de 2 anos) e compara-os com grupo de indivíduos inférteis com oligozoospermia associado ou não a outras alterações dos parâmetros espermáticos. Quando avaliada a capacidade dos níveis de SRO em distinguir estes vários grupos, a sensibilidade e especificidade revelaram-se altas com uma área sob a curva de característica operador-recetor consistentemente superior a 0,72 sugerindo que os níveis de SRO têm uma boa capacidade de diagnóstico.⁴⁸

O artigo de Dorostghoal e colaboradores de 2017 sugere ainda que os níveis de AMD têm uma precisão razoável em diferenciar os indivíduos inférteis dos indivíduos férteis, revelando uma sensibilidade de 44,64% e uma especificidade de 97,14% (área sob a curva de característica operador-recetor de 0,762).⁵¹

Vários artigos avaliam ainda o potencial da utilização do POR no diagnóstico do doente infértil, sugerindo que este método de avaliar o *stress* oxidativo permite diagnosticar a

infertilidade masculina com uma sensibilidade de 60,6% e uma especificidade de 74,3%, segundo o artigo de 2017 por Agarwal e colaboradores.⁵² Os resultados de outro artigo de Agarwal e colaboradores de 2017 mostram que, com um *cut-off* de 1,36 mV/10⁶ espermatozoides/mL, o POR pode ser utilizado para distinguir amostras de homens férteis de amostras de homens inférteis, podendo ser clinicamente útil na identificação do *stress* oxidativo em homens com risco de infertilidade que pode, de outra forma, passar despercebido com uma análise ao esperma de rotina.⁵³

Arafa e colaboradores em 2017 mostram que o POR é capaz de identificar com precisão amostras com má qualidade dos espermatozoides e que também é capaz de distinguir significativamente as amostras de indivíduos inférteis de indivíduos férteis com uma sensibilidade de 57,3% e especificidade de 78%. Quanto aos parâmetros espermáticos, apenas a motilidade progressiva mostrou uma pequena vantagem sobre o POR com uma maior precisão, apesar de um menor valor preditivo positivo, sendo que os restantes parâmetros espermáticos se revelaram como maus indicadores da infertilidade masculina. Este grupo indica ainda que o risco relativo de que uma amostra com um POR superior a 1,41 mV/10⁶ espermatozoides/mL pertencer a um indivíduo infértil era de 4,75 vezes superior ao de uma amostra com um POR abaixo desse *cut-off* ($p < 0,001$). Assim, sugerem a utilização da avaliação do POR juntamente com os parâmetros espermáticos convencionais, de modo a aumentar a qualidade das conclusões obtidas aquando da avaliação do estado da fertilidade de um indivíduo.⁵⁶

Outro artigo de 2017 elaborado por Agarwal e colaboradores mostra que, com o objetivo de distinguir o grupo controlo do grupo de pacientes, o POR tinha uma sensibilidade e especificidade otimizada de 40% e 93,3% respetivamente e com uma área sob a curva de característica operador-recetor de 0,596 ($p < 0,040$). A avaliação da morfologia dos espermatozoides mostrou o maior poder preditivo para distinguir os pacientes dos indivíduos utilizados como controlo. O POR mostrou-se capaz de distinguir os pacientes do grupo normozoospermico mesmo quando os pacientes se apresentavam com os parâmetros espermáticos com valores normais, o que vai de acordo com a ideia de que a correlação entre o *stress* oxidativo e a infertilidade masculina vai para além da correlação entre o primeiro e as alterações dos parâmetros espermáticos.⁵⁴

Assim, de forma geral, os parâmetros espermáticos, individualmente, são maus indicadores da infertilidade masculina enquanto que a avaliação do *stress* oxidativo, sobretudo através da avaliação nas amostras de sémen dos níveis de SRO ou do POR, correlacionam-se de forma significativa com a infertilidade masculina sendo capazes de distinguir indivíduos inférteis de indivíduos com fertilidade mantida com sensibilidades que variaram entre 44,64% e 91,7% e especificidades que variaram entre os 53,3% e 97,14%, valores que dependem do teste, método, *cut-off* e população utilizados.

Apesar da correlação entre os níveis de SRO e as alterações dos parâmetros espermáticos há evidências de que os níveis de SRO são marcadores independentes da infertilidade o que suporta o seu uso na prática clínica de modo a ajudar no processo de diagnóstico.

No entanto, não há um método claramente superior aos restantes e para além disto o *cut-off* sugerido nos vários estudos são diferentes entre os artigos. O consenso sobre qual método e *cut-off* mais adequados proporcionaria a realização de mais estudos e com maior número de indivíduos envolvidos para aumentar a evidência da utilidade da avaliação do *stress* oxidativo para então ser uma medida que esteja disponível na prática clínica.

Conclusão

A utilização de testes de avaliação dos níveis de SRO ou do *stress* oxidativo, na diferenciação de indivíduos inférteis de indivíduos férteis, mostram sensibilidades e especificidades na diferenciação de indivíduos inférteis de indivíduos férteis que incentivam o seu uso clínico. Além disso, mostram um poder discriminatório superior quando comparados com os parâmetros espermáticos clássicos.

Com esta revisão, é possível concluir que tais métodos podem ter utilidade ao nível do diagnóstico, sobretudo de indivíduos com infertilidade idiopática. No entanto, são necessários mais estudos para determinar que subgrupos são especialmente afetados pelo *stress* oxidativo, maximizando assim a utilização destes métodos. Também é sugerido uma potencial utilidade ao nível do prognóstico, podendo ser ainda uma ferramenta útil para decisões terapêuticas farmacológicas, assim como auxiliar e maximizar a eficácia de técnicas de PMA.

Como nenhum teste isolado consegue avaliar todos os passos envolvidos na fertilidade devem ser utilizados uma combinação de testes diferentes de modo a se complementarem entre si e de forma a providenciar uma avaliação mais completa da função espermática.

Todavia, há falta de consenso nos valores considerados normais e nos considerados patológicos, o que também se deve à falta de uma metodologia de avaliação protocolada. Assim, à medida que estes testes são introduzidos na prática clínica, estudos prospetivos irão ajudar a definir os valores *cut-off*.

Para além disto, a validação de medidas terapêuticas específicas que atuem no *stress oxidativo*, como a utilização de antioxidantes, pode levar a um maior incentivo na realização de estudos multicêntricos e de maior escala permitindo assim uma melhor definição da utilidade destes testes de avaliação do esperma tendo sempre como *outcome* final a gravidez bem-sucedida.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, o Dr. Joaquim Nunes que foi, em parte, responsável pelo meu crescente interesse na área da Medicina da Reprodução e que posteriormente aceitou acompanhar o meu Trabalho Final de Mestrado.

Também deixo o meu agradecimento à minha família pelo constante apoio incondicional e contribuição para o meu sucesso académico e pessoal.

Bibliografia

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, De Mouzon J, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod.* 2009;24(11):2683-2687.
2. Templeton A. Infertility and the establishment of pregnancy--overview. *Br Med Bull.* 2000;56(3):577-587.
3. Lindsay TJ, Vitrikas KR. Evaluation and treatment of infertility. *Am Fam Physician.* 2015;91(5):308-314.
4. A. A, S.S.R. A. Free radicals and male reproduction. *J Indian Med Assoc.* 2011;109(3):184-187.
5. Cram DS, O'Bryan MK, de Kretser DM. Male infertility. *J Androl.* 1997;22(5):738-746.
6. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril.* 2002;77(5):873-882.
7. Tomlinson J, Kessopoulou E, Barratt CLR. The diagnostic and prognostic value of traditional semen parameters. *J Androl.* 1999;20:588-593.
8. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ, Alvarez JG, Sikka SC. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril.* 2006;86(4):878-885.
9. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* 1990;186(C):1-85.
10. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S. What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology.* 2006;67(1):2-8.
11. Sikka S, Rajasekaran M, Hellstrom W. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl.* 1995;16(6):464-468.
12. Kessopoulou E, Tomlinson MJ, Barratt CLR, Bolton AE, Cooke ID. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? *J Reprod Fertil.* 1992;94(2):463-470.
13. Chow CK. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1991;11:215-232.
14. Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr.* 1991;54(May):1119S-1124S.
15. Álvarez, J.G., & Storey BT. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod.* 1983;29:548-555.
16. de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod.* 1997;2(1):48-54.

17. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Plessis SSD. Free-radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol*. 2010;78(May):1700-1708.
18. Agarwal A, Prabakaran S a. Mechanism, measurement, and Prevention of Oxidative Stress in Male Reproductive Physiology. *Indian J Exp Biol*. 2005;43(November):963-974.
19. Sharma R, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 1996;48(6):835-850.
20. Traber MG, van der Vliet a, Reznick a Z, Cross CE. Tobacco-related diseases. Is there a role for antioxidant micronutrient supplementation? *Clin Chest Med*. 2000;21(1):173-187.
21. Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*. 1999;5(5):399-420.
22. Aitken RJ. The Amoroso Lecture The human spermatozoon - a cell in crisis? *Reproduction*. 1999;115(1):1-7.
23. Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas a J, Agarwal a. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol*. 1999;161(6):1831-1834.
24. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79(4):829-843.
25. Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: Modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(6):684-703.
26. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J Urol*. 1994;152(1):107-110.
27. Duru NK, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Reprod Biol*. 2000;74(6):1200-1207.
28. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril*. 2003;80(3):531-535.
29. Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Mascha E, Sikka SC, Thomas AJ. Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility. *Fertil Steril*. 2004;82(4):871-877.
30. Nabil Aziz, Ramadan A. Saleh, Rakesh K. Sharma, Iwan Lewis-Jones, Navid Esfandiari, Anthony J. Thomas, Jr. AA. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril*. 2004;2(81):349-354.
31. Nallella K, Sharma R, Allamaneni S, Agarwal A. Identification of Male Factor

Infertility using a Novel Semen Quality Score and Reactive Oxygen Species Level. *Clinics*. 2005;60(4):317-324.

32. Athayde KS, Cocuzza M, Agarwal A, et al. Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. *J Androl*. 2007;28(4):613-620.
33. Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TIS, Liao TL, Wei YH. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril*. 2008;89(5):1183-1190.
34. Das S, Chattopadhyay R, Jana SK, et al. Cut-off value of reactive oxygen species for predicting semen quality and fertilization outcome. *Syst Biol Reprod Med*. 2008;54(1):47-54.
35. Pasqualotto FF, Sharma RK, Pasqualotto EB, Agarwal A. Poor semen quality and ROS-TAC scores in patients with idiopathic infertility. *Urol Int*. 2008;81(3):263-270.
36. Abdallah F Ben, Dammak I, Attia H, Hentati B, Ammar-Keskes L. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in infertile men: Correlation with semen parameter. *J Clin Lab Anal*. 2009;23(2):99-104.
37. Venkatesh S, Riyaz AM, Shamsi MB, et al. Clinical significance of reactive oxygen species in semen of infertile Indian men. *Andrologia*. 2009;41(4):251-256.
38. Das P, Choudhari AR, Singh AK, Singh R. Correlation among routine semen parameters, sperm viability and malondialdehyde levels in human subjects with different fertility potential. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2009;53(3):253-258.
39. Desai N, Sharma R, Makker K, Sabanegh E, Agarwal A. Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. *Fertil Steril*. 2009;92(5):1626-1631.
40. Mahfouz R, Sharma R, Thiagarajan A, et al. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2141-2146.
41. Tunc O, Thompson J, Tremellen K. Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress. *Int J Androl*. 2010;33(1):13-21.
42. Venkatesh S, Thilagavathi J, Kumar K, Deka D, Talwar P, Dada R. Cytogenetic, Y chromosome microdeletion, sperm chromatin and oxidative stress analysis in male partners of couples experiencing recurrent spontaneous abortions. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;284(6):1577-1584.
43. Chen H, Zhao H-X, Huang X-F, et al. Does High Load of Oxidants in Human Semen Contribute to Male Factor Infertility? *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(8):754-759.
44. Atig F, Raffa M, Ali H Ben, Abdelhamid K, Saad A, Ajina M. Altered antioxidant status and increased lipid per-oxidation in seminal plasma of Tunisian infertile men. *Int J Biol Sci*. 2012;8(1):139-149.

45. Aktan G, Doğru-Abbasoğlu S, Küçükgergin C, Kadioğlu A, Özdemirler-Erata G, Koçak-Toker N. Mystery of idiopathic male infertility: Is oxidative stress an actual risk? *Fertil Steril*. 2013;99(5):1211-1215.
46. Cambi M, Tamburrino L, Marchiani S, et al. Development of a specific method to evaluate 8-hydroxy, 2-deoxyguanosine in sperm nuclei: Relationship with semen quality in a cohort of 94 subjects. *Reproduction*. 2013;145(3):227-235.
47. Agarwal A, Sharma RK, Sharma R, et al. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12(1):1-9.
48. Agarwal A, Mulgund A, Sharma R, Sabanegh E. Mechanisms of oligozoospermia: an oxidative stress perspective. *Syst Biol Reprod Med*. 2014;60(4):206-216.
49. Agarwal A, Ahmad G, Sharma R. Reference values of reactive oxygen species in seminal ejaculates using chemiluminescence assay. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(12):1721-1729.
50. Mayorga-Torres BJM, Camargo M, Cadavid P, du Plessis SS, Cardona Maya WD. Are oxidative stress markers associated with unexplained male infertility? *Andrologia*. 2016;49(5):1-7.
51. Dorostghoal M, Kazeminejad SR, Shahbazian N, Pourmehdi M, Jabbari A. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia*. 2017;49(10):1-9.
52. Agarwal A, Arafa M, Chandrakumar R, Majzoub A, AlSaid S, Elbardisi H. A multicenter study to evaluate oxidative stress by oxidation–reduction potential, a reliable and reproducible method. *Andrology*. 2017;5(5):939-945.
53. Agarwal A, Roychoudhury S, Sharma R, Gupta S, Majzoub A, Sabanegh E. Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: clinical utility in male factor infertility. *Reprod Biomed Online*. 2017;34(1):48-57.
54. Agarwal A, Henkel R, Sharma R, Tadros NN, Sabanegh E. Determination of seminal oxidation–reduction potential (ORP) as an easy and cost-effective clinical marker of male infertility. *Andrologia*. 2017;50(3):1-8.
55. Zandieh Z, Vatannejad A, Doosti M, et al. Comparing reactive oxygen species and DNA fragmentation in semen samples of unexplained infertile and healthy fertile men. *Ir J Med Sci*. 2017;187(3):657-662.
56. Arafa M, Agarwal A, Al Said S, et al. Semen quality and infertility status can be identified through measures of oxidation–reduction potential. *Andrologia*. 2017;50(2):1-6.
57. Agarwal A, Wang SM. Clinical Relevance of Oxidation-Reduction Potential in the Evaluation of Male Infertility. *Urology*. 2017;104:84-89.
58. Marchesi DE, Feng HL. Sperm DNA integrity from sperm to egg. *J Androl*. 2007;28(4):481-489.

59. Hammadeh ME, Radwan M, Al-Hasani S, et al. Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and non-pregnant patients after IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2006;13(5):696-706.
60. Agarwal A, Allamaneni SSR, Nallella KP, George AT, Mascha E. Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: A qualified meta-analysis. *Fertil Steril*. 2005;84(1):228-231.
61. Saleh R, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility, from research bench to clinical practise. *J Androl*. 2002;23(6):737-752.
62. Vessey W, Perez-Miranda A, Macfarquhar R, Agarwal A, Homa S. Reactive oxygen species in human semen: Validation and qualification of a chemiluminescence assay. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1576-1583.
63. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. The reactive oxygen species - Total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod*. 1999;14(11):2801-2807.